

8/9/1 (Item 1 from file: 351)
008469010 WPI Acc No: 90-356010/48
XRAM Acc No: C90-154611

New opt. labelled nucleotide(s) having modified phosphorus atom -
useful for detecting complementary sequences and as primers for DNA
synthesis

Index Terms: NEW OPTION LABEL NUCLEOTIDE MODIFIED PHOSPHORUS ATOM; USEFUL
DETECT COMPLEMENTARY SEQUENCE PRIME DNA SYNTHESIS

Patent Assignee: (BOEF) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; (SELI/) SELIGER H H

Author (Inventor): SELIGER H H; BERNER S; MUHLEGGER K; VONDERELTZ H; BATZ H
G

Number of Patents: 005

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week	
EP 399330	A	901128	9048	(Basic)
DE 3916871	A	901129	9049	
CA 2017369	A	901124	9107	
JP 3005495	A	910111	9108	
ZA 9003975	A	910327	9117	

Priority Data (CC No Date): DE 3916871 (890524)

Applications (CC,No,Date): EP 90109092 (900515); JP 90132429 (900522); ZA
903975 (900523)

Language: German

EP and/or WO Cited Patents: EP 285058; EP 173251; US 4816569; DD 273445; EP
136543; EP 216357; WO 8607363; EP 97373; EP 278220; 4.Jnl.REF

Designated States

(Regional): AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IT; LI; LU; NL; SE

Abstract (Basic): EP 399330

Nucleotide sequences of formulae (V) and (IX) are new. Q = W in
(V) or H in (IX); K = H or the P atom of the phosphate gp. of an
additional nucleotide or sequence; J = OH or a 5'-O-atom of an
additional nucleotide or sequence; B = natural or modified nucleic
base; T = H, lower alkyl or alkoxy, azido or OH; X = O or S; L =
(n+1)valent bridging gp.; U = O, S, N or NH; n = 1-200; W = detectable
residue or a gp. into which a detectable residue can be incorporated.

Also new are nucleoside phosphoramidites of formula (I) and
phosphanes of formula (III), where A = O-protecting gp., nucleotide or
oligonucleotide; T' = H or opt. protected OH; V = protecting gp.; D =
sec. amino residue; Z = leaving gp.

USE/ADVANTAGE - (V) are (1): used for detecting complementary
nucleotide sequences by hybridisation, and (2) as primers for enzymatic
(polymerase) synthesis of double-stranded DNA. The new nucleic acids,
modified at the P atom, can be prepd. from simple starting materials,
in only a few steps and in high yield, by solid phase methods.
Modification at the P atom does not interfere with base-base bonding;
allows a given no. of modifications to be introduced at specific
positions, and avoids problems of steric hindrance from W. @ (19pp
Dwg.No.0/0)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B03; D16; R16

Int Pat Class: C07H-019/10; C07H-021/00; C12P-019/34; C12Q-001/68;
G01N-033/68; C07F-007/24; C07H-000/00

Manual Codes (CPI/A-N): B01-D01; B04-B02C; B04-B03B; B04-B04A1; B04-B04C;
B05-B01L; B11-C07A; B11-C08; B12-K04A; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

02 B615 B701 B702 B711 B712 B713 B720 B721 B731 B815 B831 B832 B833
D011 D013 D019 D840 D899 D931 D999 F011 F012 F013 F014 F015 F019 F113
F199 G010 G030 G040 G050 G100 G553 G563 H100 H101 H102 H121 H122 H123
H181 H182 H183 H2 H201 H203 H211 H213 H401 H402 H403 H405 H421 H424
H481 H482 H484 H498 H521 H721 J521 J522 J523 K0 K510 L8 L810 L811 L812
L813 L819 L821 L834 L835 L910 L922 L943 L999 M210 M211 M212 M213 M214

M215 M216 M220 M221 M222 M231 M232 M233 M240 M272 M280 M281 M282 M283
M311 M312 M313 M314 M315 M321 M322 M323 M331 M332 M333 M340 M342 M343
M344 M373 M381 M382 M383 M391 M392 M393 M423 M510 M511 M512 M513 M521
M522 M523 M530 M531 M540 M541 M710 M903 M904 P831 Q233 V600 V611 V753
V791 V795 V802 V810 01261 9048-04601-N
05 B614 B615 B701 B702 B720 B721 B731 B732 B813 B815 B833 B834 D011
D013 D019 D840 D931 D999 F011 F012 F013 F014 F015 F016 F019 F113 F199
F542 F599 G010 G030 G031 G040 G050 G100 G111 G310 G553 G563 H100 H101
H102 H121 H122 H123 H181 H182 H183 H2 H201 H202 H203 H211 H212 H213
H401 H402 H403 H404 H405 H421 H422 H423 H424 H521 H522 H523 H685 J011
J271 J290 J371 J521 J522 J523 K0 K510 L8 L810 L811 L812 L813 L819 L821
L834 L910 L922 L943 L999 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221
M222 M231 M232 M233 M240 M250 M272 M280 M281 M282 M283 M311 M312 M313
M314 M315 M321 M322 M323 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M344 M349 M373
M381 M383 M391 M392 M393 M423 M510 M511 M512 M513 M523 M530 M531 M540
M541 M710 M903 M904 Q233 V753 01261 9048-04602-N

Chemical Fragment Codes (M2):

01 B615 B701 B702 B711 B712 B713 B720 B721 B731 B815 B831 B832 B833
D011 D013 D019 D840 D899 D931 D999 F011 F012 F013 F014 F015 F019 F113
F199 F542 G010 G030 G040 G050 G100 G553 G563 H100 H101 H102 H121 H122
H123 H181 H182 H183 H2 H201 H211 H401 H402 H403 H421 H481 H482 H498
H521 H721 J521 J522 K0 K510 L8 L810 L811 L812 L813 L819 L821 L834 L835
L910 L922 L943 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M231
M232 M233 M240 M272 M280 M281 M282 M283 M311 M312 M313 M314 M315 M321
M322 M323 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M344 M373 M383 M391 M392 M393
M411 M510 M511 M512 M513 M521 M522 M523 M530 M531 M540 M541 M710 M903
M904 Q233 V0 V762 01261 9048-04601-N
04 B614 B615 B701 B711 B712 B713 B720 B721 B731 B732 B813 B815 B831
B832 B833 B834 D011 D013 D019 D840 D931 D999 F011 F012 F013 F014 F015
F019 F113 F199 F542 F599 G010 G013 G019 G030 G031 G040 G050 G100 G111
G310 G553 G563 H100 H101 H102 H121 H122 H123 H181 H2 H201 H211 H401
H421 H521 H542 H685 J011 J271 J290 J371 J521 J522 K0 K510 L8 L810 L811
L812 L813 L819 L821 L834 L910 L922 L943 M121 M129 M132 M150 M210 M211
M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M231 M232 M233 M240 M250 M272
M280 M281 M282 M283 M311 M312 M313 M314 M315 M321 M322 M323 M331 M332
M333 M340 M342 M343 M344 M349 M362 M373 M381 M383 M391 M392 M393 M411
M510 M511 M512 M513 M521 M522 M523 M530 M531 M532 M533 M540 M541 M710
M903 M904 Q233 V0 V762 01261 9048-04602-N
06 B711 B720 B721 B731 B732 B751 B813 B831 C017 C100 G010 G030 G031
G040 G050 G100 G310 G553 G563 H685 H721 J011 J271 J290 J371 M210 M211
M212 M213 M214 M215 M216 M220 M221 M222 M231 M232 M233 M273 M282 M311
M312 M313 M314 M315 M321 M322 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M344 M349
M362 M373 M381 M383 M391 M392 M411 M510 M520 M530 M531 M532 M540 M541
M710 M903 M904 Q233 9048-04603-N

Chemical Fragment Codes (M5):

03 M710 M903 M904 P831 Q233 S000 S131 S132 S133 S134 S142 S303 S312
S314 S317 S512 S514 S700 S703 S730 S731 S732 S733 S734 S735 S736 S737
S738 S740 S750 S751 S760 S761 S762 S763 S770 S800 S830 T117 T131 T132
T142 T300 T334 T600 T633 T638 T642 U300 U332 U333 U500 U501
9048-04601-N

Ring Index Numbers: 01261; 01261; 01261; 01261

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

**0 399 330
A1**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 90109092.8

22 Anmeldetag: 15.05.90

51 Int. Cl.⁵: **C07H 21/00, C07H 21/04,
C07H 19/10, C07H 19/20,
C07F 9/48, C07F 9/50,
C12Q 1/68, C12P 19/34**

30 Priorität: 24.05.89 DE 3916871

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.11.90 Patentblatt 90/48

84 Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71 Anmelder: **BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**
Sandhofer Strasse 116
D-6800 Mannheim 31(DE)

72 Erfinder: **Seliger, Heinz Hartmut, Prof. Dr.**
Hasenweg 1
D-7915 Elchingen-Thalfingen(DE)
Erfinder: **Berner, Sibylle, Dr. rer. nat.**
Goethestrasse 62
D-8900 Augsburg(DE)
Erfinder: **Mühlegger, Klaus**
Römerstrasse 7
D-8121 Polling(DE)
Erfinder: **von der Eitz, Herbert, Dr. rer. nat.**
In der Au 21
D-8120 Weilheim(DE)
Erfinder: **Batz, Hans-Georg, Dr. rer. nat.**
Traubinger Strasse 63
D-8132 Tutzing(DE)

54 **Modifiziertes Phosphoramidit-Verfahren zur Herstellung von modifizierten Nukleinsäuren.**

57 Gegenstand der Erfindung ist ein modifiziertes Phosphoramiditverfahren zur Synthese von Nukleotidsequenzen. Durch Einsatz eines modifizierten Nukleosidphosphoramidits ist es möglich, Nukleotidsequenzen herzustellen, die einen modifizierten Phosphatrest aufweisen.

EP 0 399 330 A1

Modifiziertes Phosphoramidit-Verfahren zur Herstellung von modifizierten Nukleinsäuren

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ein modifiziertes Phosphoramidit-Verfahren zur Herstellung von modifizierten Nukleinsäuren und neue Verbindungen, die in diesem Verfahren eingesetzt werden.

Nukleinsäuren sind eine der Gruppe von Verbindungen, die für das Leben auf der Welt von grundlegender Bedeutung und daher in jedem Lebewesen vorhanden sind. In ihnen ist die genetische Information gespeichert. Sie stellen außerdem ein Kriterium zur Unterscheidung und zum Nachweis verschiedener Arten von Lebewesen dar, da die Nukleinsäuresequenzen für jedes Lebewesen charakteristisch sind. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, Nukleinsäuren sowohl zu synthetisieren als auch nachzuweisen.

Nukleinsäuren können chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden. Die chemische Synthese der natürlich vorkommenden β -konfigurierten Nukleinsäuren hat in jüngster Zeit immer größere Bedeutung erlangt, da so große Mengen von Nukleinsäuren mit einer definierten Nukleotidsequenz hergestellt werden können. Die chemische Synthese hat sich insbesondere für die Synthese von β -konfigurierten Oligonukleotiden etablieren können. Je nach Art der eingesetzten Nukleotidbausteine und der Reaktionsschritte zur Ankrüpfung an das in der Sequenz benachbarte Nukleotid unterscheidet man verschiedene Verfahren:

Im Phosphodiesterverfahren wird ein Nukleosidmonophosphat, in dem alle reaktiven Gruppen mit Ausnahme des Phosphatrests geschützt sind, zusammen mit einem Kopplungsmittel, beispielsweise einem Trialkylarylsulfonsäurechlorid, mit einem weiteren Nukleosid umgesetzt, in dem alle reaktiven Reste bis auf die Hydroxygruppe, an der die Reaktion stattfinden soll, geschützt sind. Die Ausbeuten in diesem Verfahren sind gering, vor allem deswegen, weil bei den Kondensationsschritten zum Aufbau der Oligonukleotidkette unerwünschte Nebenreaktionen an den nichtveresterten OH-Funktionen der Internukleotid(phosphat)brücke ablaufen und zu komplexen Reaktionsgemischen führen. Es weist ferner den großen Nachteil auf, daß die entstandenen Phosphorsäurediester nur in wenigen protischen Lösungsmitteln, in denen die Veresterung durchgeführt werden muß, löslich sind. Solche Lösungsmittel wie Pyridin, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid haben bekannte Nachteile, wie z.B. hohe Siedepunkte. Aufgrund des polaren Charakters der Phosphodiester-Derivate muß die Isolierung und Aufreinigung über Ionenaustauscher erfolgen und kann nicht in einfacher Weise z.B. über Kieselgel unter Verwendung niedrig siedender Lösemittel (wie z.B. Dichlormethan) erfolgen.

Den Nachteil der Unlöslichkeit der Produkte in zahlreichen organischen Lösungsmitteln umgeht die Phosphotriestertermethode.

Die Phosphotriestertermethode arbeitet mit einem Phosphorsäurederivat, das nur 1 reaktive Gruppe, aber 2 durch unterschiedliche Schutzgruppen geschützte Hydroxygruppen direkt am Phosphoratom aufweist. Nach der Umsetzung mit dem ersten Nukleosid wird eine der Schutzgruppen abgespalten und die entstandene Hydroxygruppe kann dann für die Reaktion mit dem zweiten Nukleosid aktiviert werden. Diese Vorgehensweise bedeutet, daß es erforderlich ist, zwei zusätzliche Reaktionsschritte an dem Nukleosidphosphat auszuführen, was zu einer Ausbeuteverringerung an aktiviertem Nukleosidphosphat führt.

Eine besonders vorteilhafte Methode, die mit weniger Reaktionsschritten an den relativ teuren Synthesebausteinen auskommt, ist als Phosphoramiditverfahren bekannt geworden. (Gait, M.J. et al., Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press Oxford). Hier werden keine Phosphorsäurederivate, sondern Derivate der phosphorigen Säure, sogenannte Phosphoramidite eingesetzt. Folgende Reste sind an dem trivalenten Phosphoratom angebracht:

- eine reaktive Gruppe, beispielsweise ein Halogenatom, das die Verknüpfung mit dem ersten Nukleosid ermöglicht,
- eine sekundäre Aminogruppe, mit der nach Aktivierung die Verknüpfung mit dem zweiten Nukleosid bewirkt werden kann, und
- eine durch eine Schutzgruppe maskierte Hydroxygruppe.

Im ersten Schritt des Phosphoramiditverfahrens wird das Derivat der phosphorigen Säure mit einem ersten Nukleosid umgesetzt; dabei ersetzt das Nukleosid die reaktive Gruppe. Im zweiten Schritt wird selektiv der Ersatz der sekundären Aminogruppe durch ein zweites Nukleosid bewerkstelligt. Als Aktivierungs-Reagens findet im zweiten Schritt meist ein Tetrazol Verwendung. In einem folgenden Schritt wird die Nukleotidsequenz oxidiert, beispielsweise mit Jod, und die Schutzgruppe abgespalten. Das Phosphoramiditverfahren ist in einer Variante als Festphasenverfahren beschrieben. Dabei ist die wachsende Nukleotidsequenz an eine Festphase gebunden. Die Abtrennung von überschüssigen Synthesereagentien und -bausteinen sowie die Reinigung der Oligonukleotidsequenz ist dadurch stark vereinfacht worden. Kommerziell erhältliche Nukleinsäuresyntheserobotern arbeiten nach diesem Verfahren. Sie sind in ihrer Konstruktion z.B. auf die spezifischen Schritte des Phosphoramiditverfahrens abgestimmt.

Nukleinsäuren mit bekannter Nukleotidsequenz finden besonders Anwendung zum spezifischen Nach-

weis von DNA in biologischem Probenmaterial.

In solchen Nachweisverfahren wird die Eigenschaft ausgenutzt, daß die einzelnen Stränge von Nukleinsäuren mit anderen einzelsträngigen Nukleinsäuren unter Bildung eines Doppelstranges reagieren können, wenn die Einzelstränge zueinander komplementäre Nukleotidsequenzen aufweisen und beide dieselbe Konfiguration an C-1 der Ribose (α bzw. β) haben. Da die natürlich vorkommenden Nukleinsäuren hinsichtlich der Verknüpfung von Basen und Zuckern β -konfiguriert sind, kommen als komplementäre Nukleinsäuren insbesondere die β -Nukleinsäuren in Frage. Der Vorgang der Doppelstrangbildung wird Hybridisierung genannt.

Die Bildung eines Doppelstrangs kann nachgewiesen werden, wenn zur Hybridisierung mit der einzelsträngigen Nukleinsäure eine modifizierte einzelsträngige komplementäre Nukleinsäure eingesetzt wird. Anschließend wird die Menge der hybridisierten Nukleinsäuren über die Modifizierung, die beispielsweise eine radioaktive Markierung sein kann, bestimmt.

Zur Synthese von modifizierten Nukleinsäuren kann entweder eine schon vorhandene natürliche Nukleinsäure chemisch oder enzymatisch modifiziert werden, oder die Nukleotidsequenz kann unter Zuhilfenahme bereits modifizierter Nukleotid-Bausteine synthetisiert werden.

Durch Modifikation bereits fertig synthetisierter Nukleinsäuren an den Enden, wie sie beispielsweise für das 5'-Ende in der WO 86/07363 vorgeschlagen wird, können jedoch nur Nukleinsäuren hergestellt werden, die ein einziges modifiziertes Nukleotid pro Einzelstrang beinhalten. Methoden zur Bestimmung der Menge an Nukleinsäuren mit dieserart modifizierten Nukleinsäuren als Sonden sind daher wenig empfindlich.

Daher wurde beispielsweise in der EP-A 0173251 vorgeschlagen, die Basen von kompletten Nukleinsäuren durch chemische Reaktionen zu modifizieren. Dazu sind jedoch mehrere Reaktionsschritte an der Nukleinsäure erforderlich und die Modifikationsrate ist davon abhängig, ob die Nukleinsäure Basen mit freien Aminogruppen enthält, deren Modifizierung die Fähigkeit der Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäuren nicht beeinträchtigt.

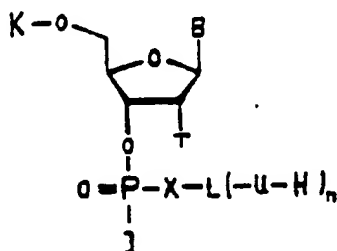
In Jäger et al. (Biochemistry Vol. 27, S. 7237 (1988)) wird die Herstellung eines Dinukleotids beschrieben, welches eine Modifikation am Phosphoratom trägt. Die Modifikation besteht in einer über einen Linker gebundenen primären Aminogruppe und wird in einem dem herkömmlichen Phosphoramiditverfahren ähnlichen Verfahren eingeführt.

Dieses Verfahren kann jedoch nicht auf den herkömmlichen Syntheseeautomaten der Phosphoramiditmethode ausgeführt werden. Ein weiterer Nachteil ist, daß keine zusätzlichen Nukleotide mehr angefügt werden können, da die freie Aminogruppe mit den dazu benutzten elektrophilen Reagenzien selbst reagiert.

Jedes der im Stand der Technik vorhandenen Verfahren weist daher beträchtliche Nachteile auf.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, die Nachteile der bekannten Verfahren zu vermeiden und insbesondere ein mit einfachen Ausgangsstoffen in wenigen Reaktionsschritten unter hohen Ausbeuten ausführbares Verfahren zur Synthese am Phosphatrest modifizierter β -konfigurierter Nukleinsäuren an Festphasen zur Verfügung zu stellen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Nukleotidsequenzen der Formel IX



IX

in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz

J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine Hydroxygruppe bedeuten,

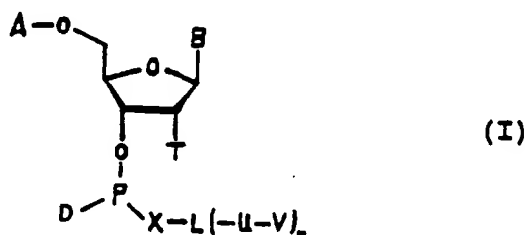
X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein (n + 1)-valentes Brückenglied.

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H und

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 bedeuten,

durch Reaktion eines Nukleosidphosphoramidits mit einem weiteren Nukleotid, das eine freie Hydroxylgruppe aufweist, und Oxidation der entstandenen Nukleotidsequenz zu einem Phosphat, dadurch gekennzeichnet, daß als Nukleosidphosphoramidit eine Verbindung der Formel I



eingesetzt wird, wobei

A eine Sauerstoffschutzgruppe, ein Nukleotid oder ein Oligonukleotid.

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,

X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,

T Wasserstoff, Niederalkyl, N₃, Niederalkoxy oder eine gegebenenfalls geschützte Hydroxygruppe.

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,

V eine abspaltbare Schutzgruppe

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und

D ein sekundärer Aminrest bedeuten.

Verfahren zur Herstellung von Nukleinsäuren über das sogenannte Phosphoramiditverfahren sind prinzipiell bekannt, beispielsweise aus Biochimie 1985, 67, 673-684. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung unterscheidet sich insbesondere dadurch von den Verfahren des Standes der Technik, daß ein anderes Nukleosidphosphoramidit, nämlich das der Formel I, als Ausgangsstoff eingesetzt wird.

Bevorzugter Rest A der Formel I ist eine Sauerstoffschutzgruppe. Schutzgruppen, die für den Schutz der 5'-Hydroxygruppe in Nukleotidsynthesen geeignet sind, sind bekannt. Besonders oft verwendet werden sauer abspaltbare Schutzgruppen, wie die Triphenylmethylgruppe oder die Dimethoxytriphenylmethylgruppe.

Wenn der Rest A ein Nukleotid oder Oligonukleotid bedeutet, so kann es sich um ein natürliches oder ein modifiziertes Nukleotid bzw. Oligonukleotid handeln. Die Nukleotide sind gegenüber den Oligonukleotiden bevorzugt, da der Syntheseaufwand bei Oligonukleotiden erhöht ist. Bei den Nukleotiden bzw. Oligonukleotiden des Rests A kann es sich auch um erfindungsgemäß hergestellte Reste halten. Reaktive Gruppen der Nukleotide bzw. Oligonukleotide des Rests A sind bevorzugt durch geeignete Schutzgruppen geschützt. Insbesondere ist die endständige 5'-Hydroxygruppe des Nukleotids bzw. Oligonukleotids des Restes A durch eine Sauerstoffschutzgruppe geschützt. Diese Sauerstoffschutzgruppe hat insbesondere die oben unter Rest A genannte Bedeutung.

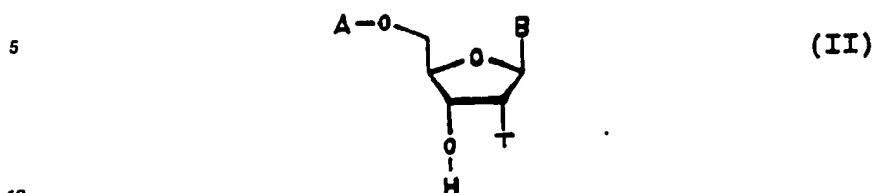
Die natürliche Nukleobase des Rests B ist bevorzugt Adenin, Thymin, Cytosin, Uracil oder Guanin. Bei den modifizierten Basen kann es sich beispielsweise um im Ring oder in den Substituenten in der Struktur veränderte Basen handeln. Beispiele sind 7-Deazaguanin oder 5-Aminoalkyluracil oder 8-Aminoethyl-amino-adenin. Bevorzugt sind solche Basen, bei denen die Watson-Crick Basenpaarung mit einer komplementären Nukleinsäure nicht oder sehr wenig beeinflußt wird.

Der Rest T kann die Ribo- oder Arabino-Konfiguration aufweisen. Bevorzugt ist die Ribo-Konfiguration. Als Schutzgruppe des Hydroxyrests kommen insbesondere basisch, sauer oder nucleophil abspaltbare Gruppen, bevorzugt die t-Butyldimethylsilyl oder Triisopropylsilyl-Gruppe in Frage.

Die Schutzgruppe V ist bevorzugt eine selektiv abspaltbare Schutzgruppe. Bevorzugt ist eine Schutzgruppe, die gleichzeitig unter den Bedingungen abgespalten wird, unter denen die fertige Nukleotidsequenz vom festen Träger abgespalten wird. Nicht bevorzugt sind daher sauer abspaltbare Schutzgruppen, etwa der Bedeutung in A. Besonders bevorzugt sind alkalisch oder ammoniakalisch abspaltbare Schutzgruppen; als besonders günstig hat sich die Fluorenylmethoxycarbonylgruppe oder die Trifluoracetylgruppe erwiesen.

Unter Alkylgruppen und Alkoxygruppen werden Reste mit 1 bis 6, bevorzugt 1 bis 4 Kohlenstoffatomen verstanden.

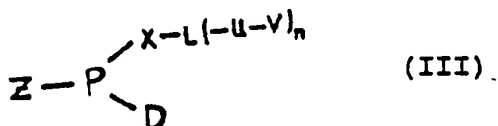
Die Verbindungen der Formel I können aus Verbindungen der Formel II



in der

- A eine Sauerstoffschutzgruppe, ein Nukleotid oder ein Oligonukleotid,
 15 B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase und
 T Wasserstoff, eine (gegebenenfalls geschützte) Hydroxygruppe, Niederalkyl, N₃ oder Niederalkyloxy
 bedeuten,
 durch Reaktion mit Phosphanen der Formel III

20



in der

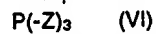
- Z eine gut austretende Gruppe,
 X Sauerstoff oder Schwefel,
 30 L ein mindestens bivalentes Brückenglied,
 U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H
 V eine abspaltbare Schutzgruppe,
 n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und
 D ein sekundärer Aminrest

35 bedeuten,

hergestellt werden. Die Reaktionsbedingungen können vom Fachmann analog zu denen gewählt werden, wie sie für die Nukleosidphosphoramidite des Standes der Technik bereits beschrieben sind. Jedoch muß darauf geachtet werden, daß dabei keine Reagenzien verwendet werden, bei deren Verwendung die Schutzgruppe V abgespalten werden kann. Diese Reaktionsbedingungen sind dem Fachmann für die einzelnen Schutzgruppen bekannt.

40 Das Phosphan der Formel III kann in einfacher Weise aus kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen synthetisiert werden. Die bevorzugte Reihenfolge der Herstellungsreaktionen sieht zunächst die Reaktion mit einem sekundären Amin vor, da dieses ein billiger Rohstoff ist. Bei diesem Reaktionsschritt können daher notfalls auch Ausbeuteverluste durch unspezifische Reaktion in Kauf genommen werden. Das

45 Phosphan der Formel III wird bevorzugt dadurch hergestellt, daß eine Verbindung der Formel (VI)



in der Z eine gut austretende Gruppe bedeutet, mit einem sekundären Amin der Formel (VII)

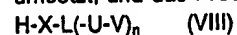


in der

50 D ein sekundärer Aminrest

bedeutet,

umsetzt, und das Produkt mit einer Verbindung der Formel VIII



in der

- 55 X Sauerstoff oder Schwefel,
 L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,
 U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,
 V eine abspaltbare Schutzgruppe.

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 bedeuten, reagieren läßt und das entstandene Produkt abtrennt. Der Rest Z ist bevorzugt Halogen, ganz besonders Chlor.

Verbindungen der Formel VII sind insbesondere dem Fachmann bekannte sekundäre Amine der Formel
 5 H-NR¹R² wobei R¹ und R² gleich oder verschieden sind und primäre, sekundäre oder tertiäre Alkylreste mit 1-10 Kohlenstoffatomen sind, oder zusammen einen gegebenenfalls alkylverzweigten Cycloalkylrest mit 5-7 Kohlenstoffatomen, der ein oder zwei Stickstoff-, Sauerstoff- und/oder Schwefelatome als Heteroatome enthalten kann, darstellen, oder N R¹ R² einen Imidazolyl-, Triazolyl-, Tetrazolyl-, 3-Nitro-1,2,4-triazolyl-, Thiazolyl-, Pyrrolyl-, Benztriazolyl- oder Benzhydroxytriazolylrest bedeutet. Als besonders bevorzugte
 10 Amine haben sich Diisopropylamin und Morpholin erwiesen.

Als Brückenglied sind insbesondere lineare oder verzweigte, gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit 1 bis 10, bevorzugt 2 bis 6 Kohlenstoffatomen zu nennen. Die Kohlenwasserstoffkette kann durch Heteroatome, beispielsweise Sauerstoff oder Schwefel unterbrochen sein. Das Brückenglied kann auch aliphatische oder aromatische Ringsysteme beinhalten. Das Brückenglied kann auch weitere Hetero-
 15 atome tragen. Im Hinblick auf die Reaktionen, die mit Verbindungen, die dieses Brückenglied beinhalten, im erfindungsgemäßen Verfahren ausgeführt werden sollen, sind jedoch solche Brückenglieder auszuschließen, die freie unsubstituierte oder primäre Aminogruppen oder Hydroxygruppen als Substituenten aufweisen. Das Brückenglied ist über n-kovalente Bindungen mit n Gruppen U verbunden. Die bevorzugte Anzahl von n beträgt 1 bis 200.

Die Verbindungen der Formel III haben gegenüber den Phosphanen des Standes der Technik den Vorteil, sowohl zur Synthese von Nukleosidphosphoramiditen für die Phosphoramiditsynthese von Nukleinsäuren einsetzbar zu sein, als auch in geschützter Form eine reaktive Gruppe aufzuweisen: diese kann als Verknüpfungsstelle für detektierbare Reste dienen.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Nukleotidsequenzen umfaßt insbesondere folgende Schritte:

25 - Kopplungsreaktion eines Nukleosidphosphoramidits der Formel I mit einem Nukleosid, das eine freie Hydroxygruppe aufweist. Das Nukleosid mit der freien Hydroxygruppe ist bevorzugt kovalent an einen festen Träger gebunden. Die übrigen reaktiven Gruppen des Nukleosids, wie Aminogruppen, Carbonylgruppen oder weitere Hydroxygruppen sind bevorzugt durch Schutzgruppen geschützt, die unter den Bedingungen der Kopplungsreaktion stabil sind. Bevorzugt ist eine eventuell vorhandene 2'-Hydroxygruppe am Zuckerrest durch eine t-Butyldimethylsilyl-gruppe geschützt. Die freie Hydroxygruppe ist bevorzugt die 5'-Hydroxygruppe des Zuckerrests.

Das Nukleosid kann ein Mononukleosid, ein Oligo- oder Polynucleotid sein. Bevorzugt ist es jedoch ein Mononucleosid, Oligo- oder Polynucleotid aus 2 bis 200, bevorzugt 20 bis 60 Nukleotidbausteinen. Die
 35 Nukleotidbausteine können natürliche oder modifizierte Nukleotide sein.

Bei dem Nukleosid kann es sich auch um ein in erfindungsgemäßer Weise modifiziertes Nukleosid handeln.

- Anschließend wird die an die Festphase gebundene Nukleotidsequenz oxidiert. Als bevorzugtes Oxidationsmittel hat sich Jod erwiesen.

40 - Daraufhin wird bevorzugt ein "capping"-Schritt durchgeführt. Dies geschieht nach bekannten Methoden.

- Selektive Abspaltung der Schutzgruppe A bzw. der Sauerstoffschutzgruppe der endständigen 5'-Hydroxygruppe des Nukleotids oder Oligonukleotids des Rests A. Im bevorzugten Fall, wenn die Sauerstoffschutzgruppe des Rests A eine sauer abspaltbare Schutzgruppe wie eine Dimethoxytriphenylmethylgruppe ist, kann sie beispielsweise durch Dichloressigsäure abgespalten werden.

45 - Diese ersten Schritte können nun, falls gewünscht, wiederholt werden. Als Mononukleosidphosphoramidit kann dabei ein herkömmliches Mononukleosidphosphoramidit oder eines der Formel I eingesetzt werden.

- Sobald die gewünschte Länge der Nukleotidsequenz erreicht ist, werden die Schutzgruppen V abgespalten. Im Falle der Aminoschutzgruppe hat sich der Trifluoracetyl- oder der Fluorenylmethoxycarbonylrest (Fmoc) als besonders vorteilhaft erwiesen.

50 - Anschließend wird die Nukleotidsequenz in bekannter Weise vom festen Träger abgespalten. Die Bedingungen richten sich nach der Art der kovalenten Bindung und werden nicht durch die erfindungsgemäße Modifizierung beeinflusst.

Besonders bevorzugt sind jedoch solche Bedingungen, unter denen die Abspaltung der Schutzgruppe V und die Abspaltung der Nukleotidsequenz vom Träger gleichzeitig ablaufen. Dies kann beispielsweise bei
 55 Verwendung eines über 3'-O-Succinyl an CPG (controlled pore glass) gebundenen Trägers und der Fmoc-Schutzgruppe als Rest V bewerkstelligt werden, indem Alkali, vorzugsweise konzentrierte wässrige Ammoniaklösung oder Aminlösung als Abspaltungsreagens verwendet wird.

- Meist wird ein Reinigungsschritt, beispielsweise eine Reinigung mittels HPLC chromatographisch oder und

eine Dialyse angeschlossen. Hier gelten die bei der Oligonucleotidsynthese gebräuchlichen Bedingungen.

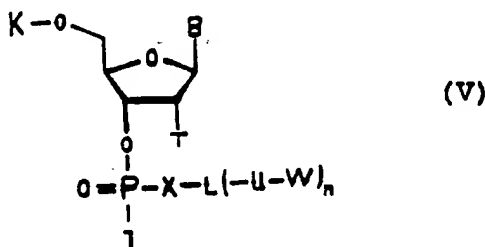
5 All diesen Schritten ist gemeinsam, daß außer der Tatsache, daß ein anderes Nukleosidphosphoramidit eingesetzt wird und daß anstelle der Reagenzien zur Abspaltung der Sauerstoffschutzgruppen am Phosphatrest des Standes der Technik Reagenzien zur Abspaltung der Schutzgruppe V eingesetzt werden, keine Änderungen im herkömmlichen Verfahrensablauf vorgenommen werden müssen. Insbesondere ist die Anzahl der Schritte die gleiche oder kleiner wie bei dem herkömmlichen Phosphoramiditverfahren. Daher ist das erfindungsgemäße Verfahren in den erhältlichen Nukleinsäuresynthesizern für die Phosphoramiditsynthese ohne apparative Änderungen durchführbar.

10 Die so hergestellte Nukleotidsequenz der Formel IX weist bevorzugt 2 bis 200, besonders bevorzugt 20 bis 60 Nukleotidbausteine auf. Davon sind bevorzugt 10 bis 80%, besonders bevorzugt 20 bis 50% der Nukleotidbausteine aus Nukleosidmonophosphaten der Formel I entstandene am P-Atom modifizierte Nukleotidbausteine. Diese modifizierten Nukleotidbausteine weisen in der Sequenz bevorzugt einen Abstand von 2-5 Nukleotiden zueinander auf.

Die Verbindungen der Formel IX sind vielseitig einsetzbar.

15 Aus den erfindungsgemäß hergestellten Nukleotidsequenzen der Formel IX können beispielsweise auf einfache Weise Nukleotidsequenzen hergestellt werden, die einen detektierbaren Rest oder einen Rest aufweisen, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann. Für den Fall, daß die Nukleotidsequenz mehrere modifizierte Nukleotidbausteine aufweist, können Nukleotidsequenzen hergestellt werden, die mehrere dieser Reste beinhalten. Dieser Fall ist bevorzugt, da es sich erwiesen hat, daß der Nachweis von Nukleinsäuren damit empfindlicher wird.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Nukleotidsequenz der Formel V,



35

in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz

40 J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine Hydroxylgruppe bedeuten

W ein detektierbarer Rest oder ein Rest ist, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann und

45 X, L, U und n die oben angegebene Bedeutung haben,

wobei anschließend an die oben genannten Schritte die entstandene Nukleotidsequenz der Formel IX mit einer Verbindung der Formel IV

Y-W (IV),

umgesetzt wird, wobei

50 Y eine reaktive Gruppe und

W ein detektierbarer Rest oder ein Rest ist, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann.

Als reaktive Gruppe Y kommt beispielsweise eine leicht nukleophil substituierbare Gruppe oder eine elektrophile Gruppe in Frage. Verbindungen der Formel IV sind beispielsweise Carbonsäurehalogenide.

Elektrophile Gruppen sind beispielsweise die Gruppen in aktivierten Estern oder Anhydriden. Ein bevorzugter Ester ist beispielsweise der N-Hydroxysuccinimidester von Haptenen, wenn diese eine Carboxylgruppe aufweisen.

Das weitere Nukleotid in der Bedeutung der Reste K bzw. J kann ein natürliches oder ein modifiziertes Nukleotid sein. Die Nukleotidsequenz in der Bedeutung der Reste K bzw. J kann sowohl natürliche, als auch

modifizierte Nukleotidbausteine enthalten. Die Nukleotidsequenz der Formel V weist bevorzugt 2 bis 200, besonders bevorzugt 20 bis 60 Nukleotidbausteine auf. Davon sind bevorzugt 10 bis 80%, besonders bevorzugt 20 bis 50% der Nukleotidbausteine aus Nukleosidmonophosphaten der Formel I entstandene Nukleotidbausteine.

- 5 Der Rest W kann nieder-, wie auch hochmolekularer Struktur sein. Bevorzugte niedermolekulare Reportermoleküle sind Farbstoffe und Haptene; bevorzugte hochmolekulare Gruppen sind z.B. Enzyme oder immunologisch aktive Substanzen wie Antigene oder Antikörper. Besonders bevorzugt sind Haptene. Von diesen sind insbesondere solche bevorzugt, die unter normalen Bedingungen in Körperflüssigkeiten nicht vorkommen, wie beispielsweise Digoxigenin. Als besonders vorteilhaft haben sich Haptene und
10 insbesondere Digoxigenin als immunologisch aktive Substanz erwiesen, da die sie aufweisenden Nukleotidsequenzen durch die Modifizierung nicht sehr in ihrem Molekulargewicht verändert werden und so als Längenstandards beispielsweise in der Gelchromatographie eingesetzt werden können.

Es hat sich herausgestellt, daß das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Nukleotidsequenzen weiterhin folgende Vorteile gegenüber dem Stand der Technik aufweist:

- 15 - Dadurch, daß die Modifizierung am Phosphoratom angebracht ist, wird die Basenpaarung der gebildeten Nukleotidsequenz mit einer komplementären Nukleotidsequenz nicht beeinträchtigt.
- Die gebildeten Nukleotidsequenzen werden von Polymerasen als Primer akzeptiert.
- Die Modifizierung kann zusätzlich zu anderen Modifizierungen, beispielsweise des Zuckerrests oder der Base, oder zu 3'- oder 5'-Endmarkierungen eingeführt werden.
20 - Es handelt sich um ein Verfahren, das eine konvergente Synthese der benötigten Bausteine beinhaltet. Solche Verfahren sind besonders vorteilhaft, da die Ausbeuten insbesondere an den teuren Nukleotidbausteinen hoch gehalten werden können.
- Es können zur Synthese der Nukleosidphosphoramidite die leicht erhältlichen, natürlich vorkommenden β -Nukleoside eingesetzt werden.
25 - Bei gleichbleibender oder sogar verringerter Anzahl von Reaktionsschritten wurde es möglich, die bekannten Vorteile des Festphasen-Phosphoramiditverfahrens zur Synthese von Nukleotidsequenzen zur Synthese von am Phosphatrest modifizierten Nukleotidsequenzen zu nutzen.
- Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, eine ganz spezielle Zahl von Modifikationen an ganz bestimmten Stellen der Sequenz einzuführen.
30 - Die gebildete modifizierte Nukleotidsequenz ist universell einsetzbar. Beispielsweise können verschiedene detektierbare Reste gewählt werden.
- Dadurch, daß die detektierbaren Reste nicht von Anfang an in den Nukleosidphosphoramiditen vorhanden sind, werden Komplikationen, während der chemischen Synthese des Nucleotides wie sie beispielsweise bei Enzymmarkierungen oder anderen empfindlichen Reportergruppen zu erwarten sind, vermieden.
35 - Die sterische Hinderung durch Reportermoleküle kann die Ausbeute und Effizienz von Oligonucleotidsynthesen verringern. Dieser Nachteil wird im erfindungsgemäßen Verfahren vermieden.

- Die Nukleotidsequenzen der Formel V können vorteilhaft in Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren in einer Probe durch Inkontaktbringen der Probe mit einer dazu im wesentlichen komplementären Nukleinsäure, Behandlung des Gemischs unter Bedingungen, die zur Hybridisierung zueinander komplementärer
40 Nukleinsäuren führt, und Nachweis des detektierbaren Restes als zur Proben-DNA komplementäre Nukleotidsequenz eingesetzt werden. Der Nachweis des detektierbaren Restes kann nach bekannten Methoden erfolgen. Wenn der detektierbare Rest eine immunologisch aktive Substanz ist, so kann der Rest mit einem markierten immunologischen Partner umgesetzt werden. Anschließend wird dann die Markierung gemessen. Als Rest W sind im Falle dieser Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren Haptene, insbesondere
45 Digoxigenin, bevorzugt.

Ebenso sind sie als Primer in der enzymatischen Synthese von doppelsträngigen Nukleinsäuren aus einzelsträngigen Nukleinsäuren geeignet. Die entstehende doppelsträngige Nukleinsäure enthält dann die Nukleotidsequenz in mindestens einem der beiden Stränge.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

50

Beispiel 1:

55 2-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl-)aminoethanol

In einem 1 l-Rundkolben werden 68,0 g (ca. 200 mMol) 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-N-hydroxy-succinimidester (Fmoc-O-Su) unter Rühren in 300 ml Dioxan gelöst. Zu der klaren Lösung werden

nacheinander 40 g in 200 ml Wasser gelöstes Na_2CO_3 , sowie 14,4 ml (238 mMol) Ethanolamin gegeben. Das sich alsbald bildende breiartige Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anderntags abgesaugt. Der Filterrückstand, der unumgesetztes Fmoc-O-Su, N-Hydroxysuccinimid sowie das gewünschte Produkt enthält, wird aus Essigester umkristallisiert. Man erhält nach Trocknen im Vakuum
 5 47,4 g = 76% der Theorie an reinem Produkt.
 $^1\text{H-NMR}$ (ppm) (DMSO): 3,4 (m, CH_2O , 2 H); 3,6 (t, CH_2N , 2H); 4,2-4,5 (m, CH_2OCO + H [C9], 3 H); 5,2 (s [b], NH, 1 H); 7,2-7,9 (m, aromatisch, 8 H);

10 Beispiel 2:

Dichlor-N, N-diisopropylamino-phosphan

15 In einem 2 l-Dreihalsrundkolben mit 500ml Tropftrichter, KPG-Rührer, Thermometer und Aceton/Trockeneisbad werden 300 ml Äther, abs., 81 ml wasserfreies Pyridin und 87,5 ml PCl_3 (1 Mol) unter Rühren auf -70°C vorgekühlt. Man tropft dazu innerhalb von 2 Stunden 142 ml Diisopropylamin (1 Mol) in 250 ml abs. Äther und hält die Temperatur bei ca. -60 bis -65°C . Nach beendeter Zugabe läßt man das breiartig verdickte Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur kommen und verdünnt zwecks besserer
 20 Rührbarkeit mit etwa 600 ml abs. Äther. Nach weiteren 3 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag über eine Glasfritte abgesaugt, und mit Äther mehrfach gewaschen. Nach Abziehen des Äthers bei Normaldruck wird erst im Wasserstrahlvakuum von nicht umgesetztem PCl_3 , Diisopropylamin und Pyridin befreit, sodann das verbleibende Öl im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. (K_p $46^\circ\text{C}/0,35$ Torr). Man erhält 73,4 g entsprechend 36% der Theorie des Phosphans.
 25 $^{31}\text{P-NMR}$ (ppm) (CHCl_3): 167,5

Beispiel 3:

30

2-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-aminoethyl-N, N-diisopropylamino-phosphochloridit

In einem 100 ml-Rundkolben werden 0,9 ml Dichlor-N, N-diisopropylamin-phosphan (5 mmol) in 30 ml abs. Tetrahydrofuran gelöst und dazu 0,4 ml wasserfreies Pyridin gegeben. Unter magnetischem Rühren
 35 tropft man zu diesem Gemisch bei Raumtemperatur eine Lösung von 1,4g 2-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethanol (5 mmol) in 20 ml abs. Tetrahydrofuran langsam während ca. 5 Stunden zu. Nach Absaugen des abgeschiedenen Pyridinhydrochlorides und Abziehen des Tetrahydrofurans wird das verbleibende Öl (2,2g = 98% der Theorie) direkt zur Herstellung des Nucleosidphosphamidites eingesetzt (siehe Beispiel 4).

40

Beispiel 4:

45 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin-3'-O-[2-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]-N, N-diisopropylaminophosphan

a) In einem 100 ml-Rundkolben werden 2,5 g 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin (4,6 mMol) in 50 ml Dichlormethan (über Na_2CO_3 destilliert) sowie 2,5 ml N-Ethyl-N, N-diisopropylamin gelöst. Dazu werden
 50 mit einer Einwegspritze 2 ml 2-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl) aminoethyl-N, N-diisopropylamino-phosphochloridit (ca. 5 mmol) gegeben. Man rührt 48 Stunden bei Raumtemperatur und dampft dann im Vakuum bis zum dickflüssigen Rückstand ein.

Zu Aufreinigung des Rohproduktes wird an Kieselgel 60 chromatographiert (Säule 30 x 2 cm, Laufmittel Petroläther 50 - 75°C /Essigsäureethylester/Dichlormethan/Pyridin = 4 : 8 : 8 : 2. Die produktenthaltenden
 55 Fraktionen werden gesammelt, das Lösungsmittel restlos im Vakuum abgezogen.

Man erhält 0,9 g entsprechend 20% der Theorie eines weißen, schaumigen Rückstandes.

b) In einem Alternativverfahren werden 5,45 g 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin (10 mmol) unter Rühren in 100 ml absolutem Dioxan gelöst. Dazu tropft man innerhalb von 30 Minuten eine Lösung von 2,7

g Bis (diisopropylamino)chlorphosphan (10 mmol), das nach S. Hamamoto, H. Takaku, Chemistry Lett. 1986, 1401-1404 dargestellt wurde, und 2.1 ml Triethylamin (15 mmol) in 100 ml Dioxan. Die Umsetzung wird dÜnnschichtchromatographisch in Methylenchlorid/Essigsäureethylester = 1:1 als Laufmittel verfolgt. Nach 2 Stunden wird der Niederschlag aus Triethylammoniumchlorid unter Argonschutzgas abfiltriert und das
 5 Filtrat eingengt (farbloser Schaum). Das gebildete 5'-O-Dimethoxytrityl-2'-desoxythymidin-3'-O-bis-(N,N-diisopropylamino)phosphan wird ohne weitere Isolierung zum gewünschten Produkt umgesetzt. Dazu wird der farblose Schaum in 100 ml absolutem Acetonitril aufgenommen und 3 g 2-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-amino-ethanol (Beispiel 1) sowie 35 mg (5 mmol) Tetrazol (sublimiert) zugegeben. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren und bricht dann die Reaktion durch Zugabe von 100 ml Essigsäureethylester
 10 ab. Nach dreimaliger Extraktion mit gesättigter Natriumchloridlösung werden die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren des Natriumsulfats wird das Filtrat eingengt. Zur Reinigung des Rohprodukts wird über Kieselgel 60 H chromatographiert: (1 = 24 cm, d = 4 cm; Laufmittel: Methylenchlorid:Essigsäureethylester = 5:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man wiederum einen farblosen Schaum. Dieser wird in 10 ml Methylenchlorid aufgenommen und mit 400 ml
 15 eiskaltem n-Hexan ausgefällt. Man erhält 1.8 g entsprechend 20% der Theorie des gewünschten Produktes als farbloses Pulver.

Die beiden Diastereomeren können sowohl im DC als auch im ³¹P-NMR unterschieden werden:
 Rf-Wert (CH₂Cl₂ EE = 1:1): 0.04, 0.15 ³¹P-NMR (ppm) (CD₃CN): 146.7, 145.8

20
Beispiel 5:

Synthese von d (Tp_{AE}TpTpTpTpTpTpTp_{AE}T)

25 Die Synthese des Oligonucleotids wurde im 1 µmol-Maßstab nach Standardprotokoll in einem vollautomatischen DNA-Synthesizer 8600 der Firma Biosearch durchgeführt. Hierzu wird prinzipiell das Synthesegerät mit einer mit 1 µmol Thymidin-Träger beschickten Reaktions-Säule bestückt und in einem ersten Reaktionsschritt die 5'-OH-Schutzgruppe (Dimethoxytrityl-) durch Behandlung mit einer 2%igen
 30 Dichloressigsäure-Lösung in Dichlormethan abgespalten. Nach Waschen der Säule mit Acetonitril erfolgt die Kupplung des im erfindungsgemäßen Sinne P-modifizierten 5'-O-dimethoxytriphenylmethyl-2'-desoxythymidin-3'-O-[2-(9-fluorenylmethoxy-carbonyl)aminoethyl]-N,N-diisopropylamino-phosphans aus Beispiel 4 unter gleichzeitiger Aktivierung mit Tetrazol in Acetonitril an die freie 5'-OH-Funktion des Start-Nucleosids. Das noch trivalent vorliegende P-Atom wird nach erneutem Waschen durch Oxidation mit einer
 35 Lösung von Jod in THF/Lutidin/H₂O in das natürliche pentavalente Phosphat überführt. Der nachfolgende Capping-Schritt mit Acetanhydrid-Dimethylaminopyridin blockiert durch Acetylierung nicht gekuppeltes 5'-OH-Nucleosid. Dadurch wird die Bildung von Fehlsequenzen unterdrückt. Nach Waschen beginnt mit erneuter Abspaltung der 5'-O-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe der Synthesesyklus von vorne. In dieser Weise werden nun 6 Thymidin-Bausteine mit nicht-modifiziertem Phosphoamidit-Teil in die Reaktionsfolge einge-
 40 bracht, bevor im letzten Zyklus eine weitere Kupplung mit dem aminoethylierten Thymidin-Phosphoamidit (Tp_{AE}) erfolgt. Nach beendeter Synthese wird durch Behandlung mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung das am Träger gebundene Oligonucleotid freigesetzt und gleichzeitig dabei auch die Fmoc-Schutzgruppe des aminoethylierten Phosphats entfernt. Es resultieren 86 ODE A₂₆₀. Dieses Roh-Gemisch wurde unter folgenden Bedingungen mittels HPLC aufgearbeitet.

45 Säule: Mono Q HR 10/10 (Pharmacia)
 Eluent A (Wasser), Eluent B (0,5 n-LiCl)
 Gradient: von A in 60 Minuten auf 50% B.
 Das Eluat wird über Nacht gegen H₂O dialysiert (Spektrapor, MWCO 1000)
 Ausbeute: 55 ODE

50
Beispiel 6:

Markierung des Oligonucleotides aus Beispiel 5 mit Digoxigenin

55 55 ODE/A₂₆₀ des Oligomers aus Beispiel 5 werden in 1 ml 0,1 m-Na-boratpuffer pH 8.5 gelöst und mit einer Lösung von 10 mg Digoxigenin-O-succinyl-amidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester in 1 ml

Dimethylformamid versetzt. Man rührt das Gemisch 18 Stunden bei Raumtemperatur, engt bis zur Trockene im Vakuum ein, löst in H₂O und trennt das Produktgemisch per HPLC:

Säule: Shandon Hypersil ODS, 25 cm x 0,4 cm

Eluent A: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Lösung

5 Eluent B: 0,1 M Triethylammoniumacetat-Lösung/Isopropanol

Gradient: von A in 30 Minuten auf 50% B

Die Produktfraktion wird im Vakuum eingedampft, in Wasser aufgenommen und über Nacht gegen destilliertes Wasser dialysiert (Sprectrapor, MWCO 1000)

Ausbeute: 11 ODE/A₂₅₀

10

Beispiel 7:

15 Vergleich der Nachweisgrenze bei DNA-Nachweisen

Drei identische Oligonukleotide (38 mere) mit HIV spezifischer Sequenz wurden in Ihren Hybridisierungseigenschaften gegen ein kloniertes HIV-DNA-Fragment (954bp PvuII/BglII-Fragment aus der gag-Region des HIV-Wfl.13-Isolats) getestet. An folgenden Stellen sind die Oligonukleotide mit Digoxigenin

20 markiert:

1. Je an einem 5'-terminalen und einem in der Mitte lokalisierten Uracil (d.h. zwei Dig-Markierungen, Basenmarkierung an C-5 des Uracil).

2. Je an einem 5'-terminalen, 3'-terminalen und in der Mitte lokalisierten Uracil (3fache Dig-Markierung, Basenmarkierung an C-5 des Uracil).

25 3. Je an einer 5'-terminalen und in der Mitte lokalisierten Phosphatgruppe (2 Dig-Markierungen/Molekül, erfindungsgemäße Markierung).

a) Hybridisierungsansatz für Oligonucleotide mit Dig-Markierung

30

Die Sample DNA wird entweder direkt auf Filter in Verdünnungsreihen von jeweils 1 µl Volumen gespottet oder nach Auftrennung im Agarose-Gel durch Southern Blot unter 20XSSC-Puffer auf die Filter transferiert. Die Fixierung erfolgt durch 3-minütige UV-Bestrahlung.

35 Die Filter werden unter folgenden Bedingungen prähybridisiert: 1 h bei 40 °C in 5xSSC, 0,5% Blocking Reagents. Die anschließende Hybridisierung mit Digmarkierten Oligonucleotiden erfolgt unter folgenden Bedingungen: Über Nacht bei 4 °C in 5xSSC, 0,5% Blocking Reagents, 200 ng Oligonucleotide pro ml Hybridisierungslösung.

Die Filter werden danach 4x10 min in 2xSSC, 0,1% SDS bei 40 °C gewaschen.

40 Die Detektion wird analog zu dem nicht-radioaktiven Markierungs- und Detektionskit (Boehringer Mannheim GmbH) mittels POD-markierten Antikörpers gegen Digoxigenin durchgeführt.

b) Ergebnisse:

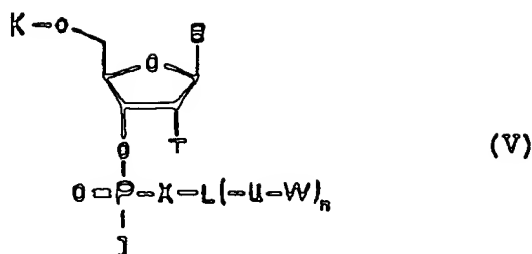
45

Nachweisgrenze der gespotteten/geblotteten Sample DNA	
mit zweifach basenmarkiertem Oligonukleotid (1):	10 ng
mit dreifach basenmarkiertem Oligonukleotid (2):	10 ng
50 mit zweifach über Phosphat markiertem Oligonukleotid (3):	1-10 ng

55

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Nukleotidsequenz der Formel V



in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

15 J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

B eine natürliche oder modifizierte Nukleinbase,

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkoxy oder eine Hydroxylgruppe,

X Sauerstoff oder Schwefel,

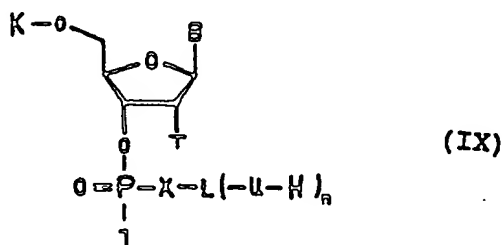
20 L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,

W ein detektierbarer Rest oder ein Rest ist, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann und

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 ist,

25 durch Umsetzung einer Nukleotidsequenz der Formel IX.



in der

40 K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,

45 T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine Hydroxygruppe,

X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H und

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 bedeuten,

50 mit einer Verbindung der Formel IV

Y-W (IV),

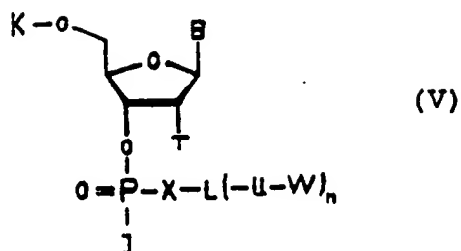
wobei

Y eine reaktive Gruppe und

W ein detektierbarer Rest oder ein Rest ist, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann.

55 2. Nukleotidsequenz der Formel V

5



10

in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

B eine natürliche oder modifizierte Nukleinbase,

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkoxy oder eine Hydroxylgruppe,

20 X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,

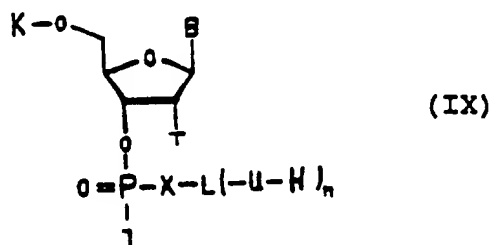
U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,

W ein detektierbarer Rest oder ein Rest ist, der in einen detektierbaren Rest überführt werden kann und

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 ist.

25 3. Verfahren zur Herstellung von Nukleotidsequenzen der Formel IX

30



35

in der

40 K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

45 B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkoxy oder eine Hydroxygruppe,

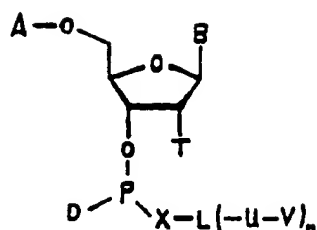
X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein (n + 1)-valentes Brückenglied,

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H und

50 n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 bedeuten,
durch Reaktion einer Verbindung der Formel I

55



I)

wobei

A eine Sauerstoffschutzgruppe, ein Nukleotid oder ein Oligonukleotid.

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,

15 X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein $(n + 1)$ -valentes Brückenglied,

T Wasserstoff oder eine gegebenenfalls geschützte Hydroxygruppe,

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,

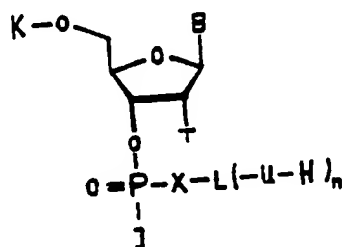
V eine abspaltbare Schutzgruppe,

20 n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und

D ein sekundärer Aminrest bedeuten.

mit einem weiteren Nukleosid, das eine freie 5'-Hydroxylgruppe aufweist und Oxidation der entstandenen Nukleotidsequenz.

4. Nukleotidsequenz der Formel IX



(IX)

in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz.

40 J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine Hydroxygruppe,

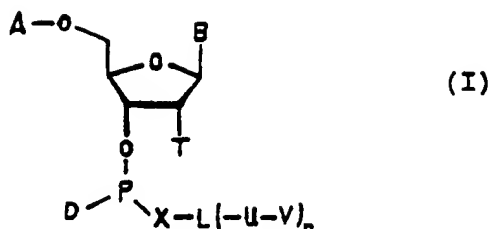
45 X Sauerstoff oder Schwefel,

L ein $(n + 1)$ -valentes Brückenglied,

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H und

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 bedeuten.

5. Nukleosidphosphoramidit der Formel I

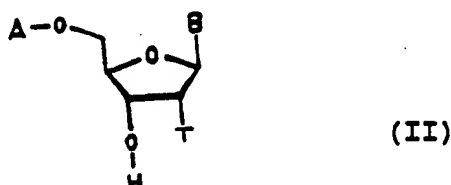


wobei

- A eine Sauerstoffschutzgruppe, ein Nukleotid oder ein Oligonukleotid,
 B eine natürliche oder modifizierte Nukleobase,
 15 X Sauerstoff oder Schwefel,
 L ein $(n + 1)$ -valentes Brückenglied,
 T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine gegebenenfalls geschützte Hydroxygruppe,
 U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,
 V eine abspaltbare Schutzgruppe,
 20 n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und
 D ein sekundärer Aminrest bedeuten.

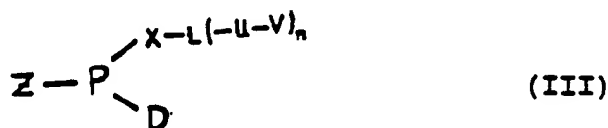
6. Verwendung von Nukleosidphosphoramiditen der Formel I zur Herstellung von Verbindungen der Formel V.

- 25 7. Verfahren zur Herstellung eines Nukleosidphosphoramidits der Formel I, durch Umsetzung einer Verbindung der Formel II



in der

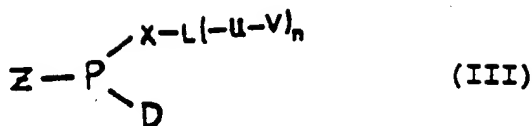
- A eine Sauerstoffschutzgruppe, ein Nukleotid oder ein Oligonukleotid,
 B eine natürliche oder modifizierte Nukleinbase und
 40 T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkyloxy oder eine gegebenenfalls geschützte Hydroxygruppe,
 bedeuten, mit einem Phosphan der Formel III



in der

- Z eine gut austretende Gruppe,
 X Sauerstoff oder Schwefel,
 L ein mindestens bivalentes Brückenglied,
 55 U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,
 V eine abspaltbare Schutzgruppe,
 n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und
 D sekundärer Aminrest bedeuten.

8. Phosphan der Formel III



10

in der

Z eine gut austretende Gruppe.

X Sauerstoff oder Schwefel.

L ein mindestens bivalentes Brückenglied.

15

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H.

V eine abspaltbare Schutzgruppe.

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200 und

D ein sekundärer Aminrest bedeuten.

9. Verfahren zur Herstellung von Phosphanen, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der

20

Formel (VI)

 $\text{P}(-\text{Z})_3$ (VI)

in der Z eine gut austretende Gruppe bedeutet, mit einem sekundären Amin der Formel (VII)

 H-D (VII)

in der

25

D ein sekundärer Aminrest bedeuten,

umsetzt, und das Produkt mit einer Verbindung der Formel VIII

 $\text{H-X-L}(-\text{U-V})_n$ (VIII)

in der

X Sauerstoff oder Schwefel,

30

L ein $(n + 1)$ -valentes Brückenglied.

U Sauerstoff, Schwefel, Stickstoff oder N-H,

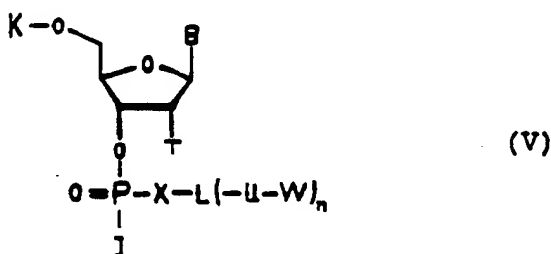
V eine abspaltbare Schutzgruppe,

n eine natürliche Zahl von 1 bis 200

bedeuten, reagieren läßt und das entstandene Produkt abtrennt.

35

10. Verwendung einer Nukleotidsequenz der Formel (V)



40

45

in der

K Wasserstoff oder das Phosphoratom des Phosphatrests eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

J eine Hydroxygruppe oder ein 5'-Sauerstoffatom eines weiteren Nukleotids oder einer Nukleotidsequenz,

B eine natürliche oder modifizierte Nukleinbase,

T Wasserstoff, Niederalkyl, Azid, Niederalkoxy oder eine Hydroxylgruppe bedeuten und

55

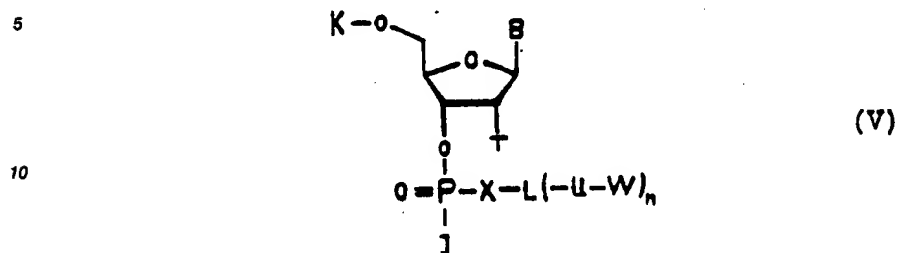
X, L, U, W und n die oben angegebene Bedeutung haben,

zum Nachweis einer zu dieser Nukleotidsequenz im wesentlichen komplementären Nukleotidsequenz.

11. Reagenz zum Nachweis einer Nukleinsäure in einer Probe durch Inkontaktbringen der Probe mit einer dazu im wesentlichen komplementären Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß es als zur Proben-

DNA komplementäre Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz der Formel (V) enthält.

12. Verwendung einer Nukleotidsequenz der Formel (V)



¹⁵ als Primer in der enzymatischen Synthese von doppelsträngigen Nukleinsäuren.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90109092.8

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE						
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (in Cl ⁷)			
X	EP - A2 - 0 285 058 (ENZO BIOCHEM, INC.) * Patentansprüche *	2, 10-12	C 07 H 21/00 C 07 H 21/04 C 07 H 19/10 C 07 H 19/20			
D,X	EP - A2 - 0 173 251 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Beispiele; Ansprüche *	1,2, 10,11	C 07 F 9/48 C 07 F 9/50 C 12 Q 1/68 C 12 P 19/34			
X	US - A - 4 816 569 (KENICHI MIYOSHI) * Fig. 2-4; Ansprüche *	3,4				
P,X	DD - A1 - 273 445 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) * Gesamt *	1,2,12				
D,A	M.J. GAIT: "Oligonucleotide synthesis; a practical approach" IRL PRESS, OXFORD, 1984 Seiten 34-49 * Seiten 41-44 *	1-7				
D,A	BIOCHEMISTRY, Band 27, Nr. 16, August 9, 1988 JÄGER et al. "Oligonucleotide N-Alkylphosphoramidates: Synthesis and Binding to Polynucleotides" Seiten 7237-7246 * Gesamt *	1-7				
D,A	BIOCHIMIE, 67, Nr. 12, 1985 N.TH. THUONG et al. "Chemical synthesis of natural and modified oligodeoxynucleotides" Seiten 673-684 * Gesamt *	1-7				
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.						
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 22-08-1990	Prüfer JANISCH			
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (in Cl⁷) C 07 H 21/00 C 07 H 19/00 C 12 P 19/00 C 07 F C 12 Q</td><td>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (in Cl⁷) C 07 H 21/00 C 07 H 19/00 C 12 P 19/00 C 07 F C 12 Q	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (in Cl⁷) C 07 H 21/00 C 07 H 19/00 C 12 P 19/00 C 07 F C 12 Q	E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument				



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE					
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IN C I)		
A	-- <u>EP - B1 - 0 136 543</u> (HOECHST AG) * Ansprüche 1,9 *	4,5,8			
A	-- <u>EP - A2/A3 - 0 216 357</u> (NIPPON ZEON CO.LTD) * Beispiele 1,2; Referenz- beispiele; Ansprüche *	5,7,8			
D,A	-- <u>WO - A1 - 86/07 363</u> (AMGEN) * Ansprüche *	3-7			
D,A	-- CHEMISTRY LETTERS, Nr. 7, 1986 The Chemical Society of Japan, SH. HAMAMOTO et al. "New Approach to the Synthe- sis of Deoxyribonucleoside Phosphoramidite Derivatives" Seiten 1401-1404 * Gesamt *	5,7-9			
A	-- <u>EP - A2 - 0 097 373</u> (ENZO BIOCHEM, INC.) * Beispiele; Ansprüche *	1, 10-12	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IN C I)		
A	-- <u>EP - A1 - 0 278 220</u> (ABBOTT LAB.) * Beispiel 3; Ansprüche *	10,11			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.					
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 22-08-1990	Prüfer JANISCH		
<table border="0"><tr><td>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument</td></tr></table>				KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, überein- stimmendes Dokument				